



**Márcia Fernanda**                      **Novo inibidor da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase: relevância**  
**Ferreira Maia de Castro**   **para a neurotoxicidade do alumínio**



**Márcia Fernanda  
Ferreira Maia de Castro**      **Novo inibidor da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase: relevância  
para a neurotoxicidade do alumínio**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia (2º Ciclo), realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves, Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. António José Arsénia Nogueira**

Professor associado com agregação do Departamento Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Maria Paula Polónia Gonçalves**

Professor associado do Departamento Biologia da Universidade de Aveiro

**Inv. Dr. António Francisco Rosa Gomes Ambrósio**

Investigador auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

## **agradecimentos**

À Professora Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves orientadora desta Dissertação, expresso profundo reconhecimento pelo apoio científico e acompanhamento permanente, bem como a amizade e incentivo que sempre me transmitiu.

Ao *PRASSIS Istituto Ricerche Sigma-Tau S.p.A* pelo fornecimento gratuito do composto PST 2238.

Aos colegas de laboratório e de mestrado que estiveram sempre presentes, mesmo nas mais pequenas ajudas.

Aos meus colegas de trabalho pelo incentivo e palavras de verdadeira amizade que me fizeram acreditar que iria conseguir...

À minha família, pelo tempo dispendido no auxílio de outras tarefas, assim como pelo incentivo e apoio que sempre me deram.

Por fim ao meu marido e às minhas filhas Eva e Rita pelos mimos dados e pela alegria que me fizeram recuperar forças e continuar.

## palavras-chave

(Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, PST 2238, alumínio, neurotoxicidade, sinaptossomas, rato.

## resumo

O alumínio é considerado um agente neurotóxico para o Homem desde 1886 tendo sido, desde então, demonstrada uma ampla gama de efeitos tóxicos do alumínio a nível celular. O presumível envolvimento da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase no desenrolar da acção neurotóxica do alumínio tem sido invocado por vários investigadores periodicamente. A (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, uma proteína integral da membrana plasmática de todas as células eucarióticas, é o receptor funcional dos esteroides cardiotónicos, como a ubaína, e uma bomba iónica de transdução energética, que converte a energia livre do ATP em gradientes electroquímicos iónicos (bomba de Na e K). Ao nível dos terminais nervosos cerebrais, concentrações submilimolares de AlCl<sub>3</sub> reduzem a velocidade máxima da reacção hidrolítica e diminuem a sensibilidade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase integrada na membrana a concentrações submicromolares de ubaína. Durante os últimos anos, foi caracterizada pormenorizadamente uma nova família de compostos anti-hipertensivos, que antagonizam o efeito da ubaína. Um destes compostos, nomeadamente o PST 2238, interage com a (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase renal, formando complexos enzima-inibidor menos estáveis do que os formados na presença de ubaína. Ambos os compostos, AlCl<sub>3</sub> e PST 2238, parecem ser inibidores não competitivos da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase e interferir na ligação de alta afinidade da ubaína à (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. A (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase é caracterizada por uma heterogeneidade molecular complexa que resulta da expressão e associação diferenciada das múltiplas isoformas das subunidades catalíticas e reguladoras. Este estudo realizou-se com o objectivo específico de determinar se o PST 2238 inibe a (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase localizada nos terminais nervosos cerebrais. Para tal, estudou-se o efeito do PST 2238 na (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase em sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral do rato após congelamento e descongelamento. Observou-se que o PST 2238 inibe a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase sinaptossomal, de forma dependente da concentração. Na presença de concentrações saturantes de ATP, uma inibição de 10% foi observada na presença de PST 2238 0,5 nM, e para concentrações superiores a 60 µM foi registado o efeito inibitório máximo (~ 70%). Na gama de concentrações 50 nM – 5 µM foi observado um patamar intermédio de inibição moderada (30%) na curva "log dose-resposta". Na presença da concentração máxima inibitória de AlCl<sub>3</sub> submicromolar (300 µM,) uma significativa redução dependente de concentração da actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase só foi observada quando foram utilizadas concentrações elevadas de PST 2238 (> 5 µM). Em conclusão, o perfil de inibição do PST 2238 na (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase cerebral parece ser diferente do encontrado no rim. O PST 2238 poderá ser útil no estudo do(s) mecanismo(s), mediado(s) pela (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, da acção neurotóxica do alumínio.

## keywords

(Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, PST2238, aluminium, neurotoxicity, synaptosomes, rat .

## abstract

A wide range of toxic effects of aluminium has been demonstrated at cellular level since it was first recognized as a human neurotoxic agent in 1886. The putative involvement of the (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase in the progress of the aluminium neurotoxic action has been claimed by several investigators periodically. The (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase, an integral protein of the plasma membrane of all eukaryotic cells, is the functional receptor for cardiotonic steroids, such as ouabain, and an energy-transducing ion pump that converts the free energy of ATP into transmembrane ion gradients (Na-K pump). At the level of brain nerve terminals, submillimolar concentrations of AlCl<sub>3</sub> reduce the maximal rate of the hydrolytic reaction and decrease the sensitivity of the membrane-bound (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase to submicromolar concentrations of ouabain. During the last few years a new family of antihypertensive compounds that antagonize the pressor effect of ouabain has been characterized extensively. One of these compounds, namely PST 2238, was shown to act on the renal (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase specifically by forming less stable enzyme-inhibitor complexes than the ones formed in the presence of ouabain. Both compounds, AlCl<sub>3</sub> and PST 2238, seem to be non-competitive inhibitors of the (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase and to interfere with the high-affinity binding of ouabain to (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. The (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase is characterized by a complex molecular heterogeneity that results from the expression and differential association of multiple isoforms of both catalytic and regulatory subunits. This study was undertaken with the specific aim of determining whether PST 2238 inhibits the (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase located at brain nerve terminals, by studying the effect of PST 2238 on (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase of freeze-thawed synaptosomes isolated from rat brain cortex. We observed that PST 2238 inhibits the synaptosomal (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase activity, in a concentration-dependent way. At non-limiting ATP concentration, inhibition (10%) was observed in the presence of 0.5 nM PST 2238, and concentrations higher than 60 μM promoted the maximal inhibitory effect (~70%). An intermediate plateau of moderate inhibition (30%) in "log dose - response curve" was observed in the 50 nM – 5 μM concentration range. In the presence of the maximum inhibitory concentration of submicromolar AlCl<sub>3</sub> (300 μM), a significant PST 2238 concentration-dependent reduction of the synaptosomal (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase activity was only observed when high concentrations of PST 2238 (> 5 μM) were used. In conclusion, the (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase inhibitory profile of PST 2238 in brain appears to be different than that found in kidney. PST 2238 could be of benefit to study the aluminium neurotoxic mechanism(s) involving (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase.

# ÍNDICE

	Páginas
<b>Abreviaturas</b>	1
<b>I– Introdução</b>	3
1- A (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )ATPase nas células nervosas	5
2- Alguns inibidores da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )ATPase	9
2.1- Ubaína	9
2.2- PST 2238	11
2.3- Alumínio	13
3- Objectivos	17
<b>II- Material e Métodos</b>	19
1- Soluções	21
2- Preparação do material biológico	21
3- Determinação da concentração de proteína	22
4- Determinação da actividade da ATPase	22
5- Análise de dados	23
<b>III- Resultados e Discussão</b>	25
1- A actividade da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )ATPase sinaptossomal não é alterada na presença de DMSO a 5%	28
2- O PST 2238 inibe a (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )ATPase sinaptossomal	30
3- Efeito do alumínio na inibição da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )ATPase por PST 2238	36
<b>IV- Conclusão</b>	41
<b>V- Bibliografia</b>	45

## Abreviaturas

ADP	adenosina-5'-difosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
ATPase	adenosinatrifosfatase
DMSO	dimetilsulfóxido
EGTA	ácido etilenoglicol-bis[ $\beta$ -amino-(éter etílico)]-N,N'- tetracético
HEPES	ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanossulfónico]
P <sub>i</sub>	fosfato inorgânico
PST 2238	17 $\beta$ -(3-furyl)-5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecilsulfato de sódio
TCA	ácido tricloroacético
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
V <sub>máx</sub>	velocidade máxima da reacção

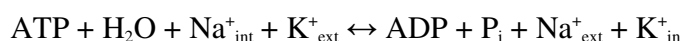


## I - Introdução

## 1 - A (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase nas células nervosas

Em 1957, Jens Cristian Skou descobriu a (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase e propôs o seu papel na extrusão activa do Na<sup>+</sup> da célula nervosa (Skou, 1957).

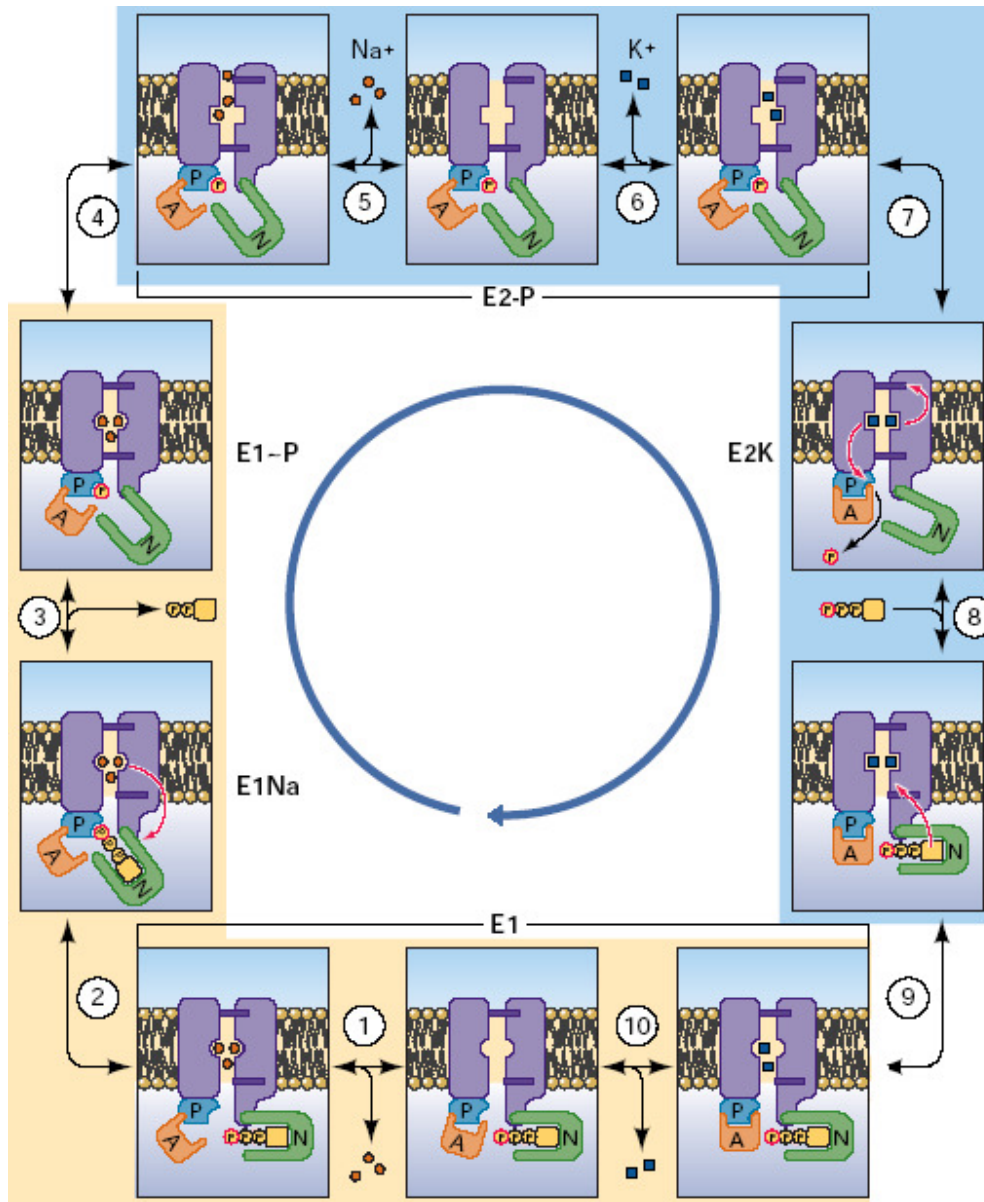
A (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase (EC 3.6.3.9) pertence à família das ATPases do tipo P, ocorrendo, durante o ciclo de transporte de iões acoplado à hidrólise de ATP, a sua modificação covalente por fosforilação (Geering, 2006). A (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase também é conhecida com a designação de bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> e é responsável pela manutenção dos gradientes de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana plasmática de todas as células eucarióticas (Skou, 1965; Clausen, 2003; Horisberger, 2004). Assim, esta enzima hidrolisa o ATP em ADP e P<sub>i</sub>, enquanto bombeia Na<sup>+</sup> para o exterior e K<sup>+</sup> para o interior da célula contra os respectivos gradientes electroquímicos, de acordo com a seguinte equação:



Durante cada ciclo de transporte, três iões de sódio e apenas dois iões de potássio são translocados através da membrana plasmática. Por conseguinte, esta bomba é electrogénica, contribuindo para aumentar a amplitude do potencial de membrana da célula.

A (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase apresenta um mecanismo de reacção que envolve dois estados conformacionais, denominados por E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>. Estas duas conformações, para além de exibirem diferentes afinidades de ligação de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, ATP e doutros ligandos, diferem na exposição dos locais de ligação de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> aos espaços intra e extracelulares. Tal como se pode observar na Fig. 1, o primeiro passo do ciclo da reacção consiste na ligação dos três iões de sódio aos locais com elevada afinidade para estes iões. A enzima hidrolisa ATP, ocorrendo a fosforilação num resíduo de aspartato do segmento intracelular da cadeia polipeptídica, e consequente formação de (Na<sub>3</sub>)E<sub>1</sub>-P. De seguida, ocorre a transição para a conformação P-E<sub>2</sub>(Na<sub>3</sub>), acompanhada da libertação dos iões para o espaço extracelular. Durante esta fase, a afinidade dos locais de ligação de K<sup>+</sup> expostos ao espaço extracelular aumenta. Os dois iões de potássio ligam-se à enzima formando P-E<sub>2</sub>(K<sub>2</sub>). A ligação de K<sup>+</sup> à enzima é seguida pela sua desfosforilação E<sub>2</sub>(K<sub>2</sub>) e consequente translocação dos iões de potássio para o interior da

célula. A libertação dos iões de  $K^+$  para o espaço intracelular é favorecida pela ligação de ATP e consequente transição para a conformação  $E_1$  (Horisberger, 2004).

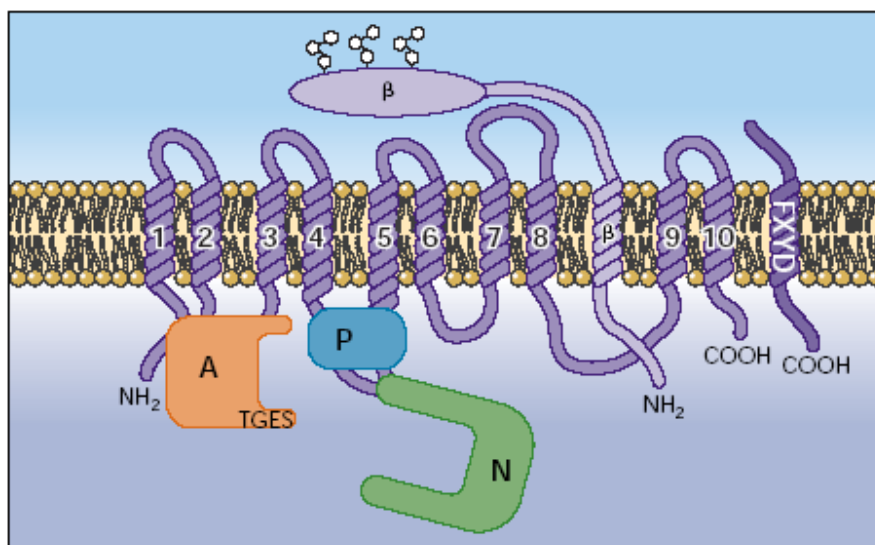


**Figura 1 – Ciclo da reacção da  $(Na^+/K^+)ATPase$ : as principais etapas do transporte dos catiões** (adaptado de Horisberger, 2004). Explicação no texto.

Para além das funções desempenhadas pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  já descritas, a sua importância fisiológica para os diferentes tipos de células está intimamente ligada às funções celulares especializadas. As células nervosas são células excitáveis, envolvidas na codificação e transmissão de informação. Durante este processo, nomeadamente durante a génese e condução do potencial de acção, ocorrem alterações significativas da permeabilidade selectiva da membrana plasmática a  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (Rutecki, 1992; Lamas, 2005). Além do mais, muitos dos transportadores plasmáticos dependem do gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  para efectuarem o transporte de neurotransmissores através da membrana plasmática das células nervosas (Kanner & Zomot, 2008). A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é o principal agente responsável pela reposição e manutenção dos gradientes electroquímicos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática e, por conseguinte, a sua actividade é fundamental para assegurar a reposição das condições de repouso.

Por outro lado, o papel da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  como transductor de sinais tem vindo a ser evidenciado por vários investigadores (Xie, 2003; Xie & Cai, 2003; Weidemann, 2005; Contreras *et al*, 2006; Liu & Askari, 2006; Pierre & Xie, 2006; Schoner & Scheiner-Bobis, 2007; Tian & Xie, 2008). A proteína transmembranar  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é, simultaneamente, um receptor de sinais gerados por outras proteínas e moléculas não-proteicas, que integra várias vias de sinalização intracelular, como por exemplo as mediadas por ERK1/2 e cálcio intracelular.

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é composta por duas subunidades polipeptídicas obrigatórias, a subunidade catalítica  $\alpha$  ( massa molecular  $\sim 112$  kDa) e uma subunidade reguladora  $\beta$  (massa molecular  $\sim 35$  a  $60$  kDa de acordo com a extensão de glicosilação). Pode ainda conter uma terceira subunidade, não obrigatória, a subunidade proteolípídica  $\gamma$  (massa molecular  $\sim 7,4$  kDa), que pertence à família FXYD, tendo também um papel regulador (Béguin *et al*, 1997; Arystarkhova *et al.*, 1999; Clausen, 2003; Geering, 2006) (Fig. 2). A subunidade  $\alpha$  possui 10 segmentos transmembranares. Grande parte da cadeia  $\alpha$ , incluindo o centro catalítico, forma um domínio de localização citoplasmática entre o quarto e o quinto segmento transmembranar. A subunidade  $\beta$  está na sua maior parte exposta ao exterior da célula. Assim como a subunidade  $\beta$ , a subunidade  $\gamma$  atravessa a membrana plasmática (Horisberger, 2004). A enzima integrada em membranas biológicas pode ainda formar complexos oligoméricos constituídos



A subunidade  $\alpha$  é transmembranar e contém os locais de ligação de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,

olhos, a subunidade  $\alpha_3$  é encontrada quase exclusivamente nos ovários e nos neurónios, podendo também ser encontrada nos glóbulos brancos e no coração de algumas espécies (Shamraj *et al*, 1991; Stengelin & Hoffman, 1997; Dostanic-Larson *et al*, 2006). A subunidade  $\alpha_4$  é especificamente sintetizada durante a espermatogénese (Shamraj *et al*, 1994). A subunidade  $\beta$  tem um papel fundamental na maturação estrutural e funcional da subunidade catalítica  $\alpha$ . Sabe-se que a subunidade  $\beta$  tem duas funções principais. É responsável pela elevada afinidade por catiões da enzima e protege a subunidade  $\alpha$  contra a degradação celular por proteólise. A associação de subunidades  $\alpha$  com diferentes subunidades  $\beta$  produzem isozimas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  com diferentes afinidades para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATP e ubaína (Hasler *et al*, 2001). É razoável acreditar que a distribuição das isoformas nos diversos tecidos está relacionado com a função específica que desempenham nos tecidos em que são expressas (Dostanic-Larson *et al*, 2006).

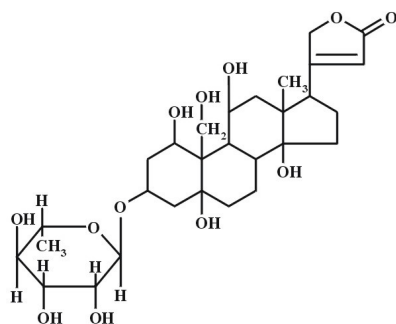
## 2 – Alguns inibidores da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$

### 2.1 Ubaína

Em 1991, a ubaína foi identificada como uma hormona endógena nos mamíferos. Até à data são conhecidas de origem animal as ubaínas, humana (Hamlyn *et al*, 1991; Mathews *et al*, 1991) e bovina (Schneider *et al*, 1998; Kawamura *et al*, 1999). A ubaína parecer ser, pelo menos, sintetizada na glândula supra-renal e no hipotálamo (Dvela *et al*, 2007; Schoner & Scheiner-Bobis, 2007).

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é o único receptor/entidade-alvo conhecido de digitálicos, tais como a digoxina e digitoxina, cujo efeito inotrópico positivo reduz a taquiarritmia supraventricular associada à insuficiência cardíaca, melhorando a capacidade dinâmica do coração (acção cardiotónica). A ubaína de origem vegetal (extraída a partir de sementes de, por exemplo, *Strophanthus gratus* e *Acokanthera ouabaio*) produz o mesmo tipo de efeitos a nível cardiovascular que os anteriormente descritos (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007). Por outro lado, quando em concentrações elevadas inibe total e especificamente a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ ,

sendo, por isso, o inibidor mais utilizado na medição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Dvela *et al*, 2007). A estrutura molecular da ubaína ( $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_{12}$ ) é apresentada na Fig. 3.

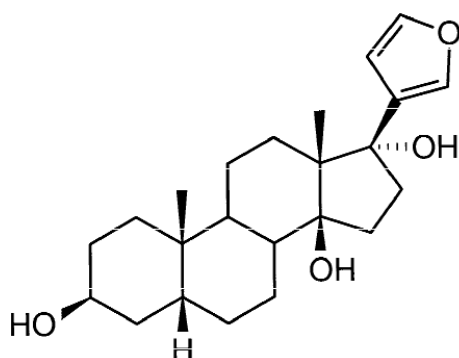


**Figura 3 – Representação esquemática da estrutura molecular da ubaína.**

Os esteróides cardiotónicos, como a ubaína, parecem possuir dois tipos de acções mediadas pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Para baixas concentrações actuam como 1<sup>os</sup> mensageiros, enquanto que agem como inibidores da actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , quando em concentrações elevadas. Estima-se que a concentração de ubaína no plasma sanguíneo seja aproximadamente 3-190 pM. ( Xie & Cai, 2003; Dvela *et al*, 2007). Sabe-se ainda que elevadas concentrações de ubaína circulante são detectadas em pacientes com insuficiência cardíaca e hipertensão (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007). A existência de um outro inibidor endógeno da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , *ouabain-like factor (OLF)*, foi confirmada em vários estudos (Bauer *et al*, 2005; Dostanic-Larson *et al*, 2006). Ambas as substâncias, cujas estruturas são similares, inibem a enzima purificada e parecem actuar de forma semelhante (Bauer *et al*, 2005). Curiosamente, as diferentes isoformas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  possuem sensibilidades diferentes em relação ao *OLF*, à semelhança do verificado relativamente à ubaína (Dostanic-Larson *et al*, 2006). No caso da ubaína, a isoforma mais sensível é a  $\alpha_3$  e a menos sensível é a  $\alpha_4$ , enquanto que para a *OLF* a isoforma mais sensível é a  $\alpha_1$  (Ferrari *et al*, 1999; Dvela *et al*, 2007). As diferenças de sensibilidade exibidas parecem estar relacionadas com a afinidade relativa dos locais de ligação destes compostos nas diferentes isoformas da subunidade  $\alpha$  (Dostanic-Larson *et al*, 2006).

## 2.2 PST 2238

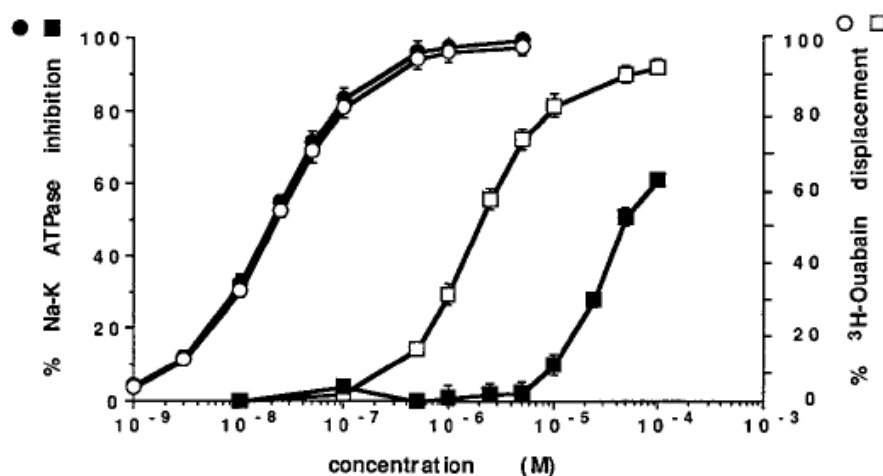
Vários investigadores demonstraram que a administração crónica de ubaína conduz ao desenvolvimento de hipertensão nos ratos (Goto *et al*, 1997; Ferrari *et al*, 1999). Com a finalidade de evitar os efeitos “indesejáveis” da ubaína a nível cardiovascular e/ou hormonal foi encetada a pesquisa de compostos alternativos. Um dos compostos sintetizados, o PST 2238, revelou-se eficaz como compostos anti-hipertensivo (Ferrari *et al*, 1998, 1999).



**Figura 4 – Representação esquemática da estrutura molecular do PST 2238** (Ferrari *et al*, 2006).

O efeito do PST 2238 na (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase foi exaustivamente caracterizado por Ferrari e colaboradores (Quadri *et al*, 1997; Ferrari *et al*, 1998, 1999) em dois tipos de ensaios, nomeadamente em ensaios de inibição da actividade hidrolítica de ATP da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase e ensaios de competição da ligação de ubaína à (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase (Figura 5). Estes estudos permitiram caracterizar o efeito do PST 2238 como inibidor da actividade enzimática, actividade fundamental para a função de “bomba de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>” da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase e como ligando do receptor de esteróides cardiotónicos, actividade fundamental para a função de “transdutor de sinais extracelulares” da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase.





**Figura 5 – Inibição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (●,■) e da ligação de  $^3\text{H}$ -ubaína à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (○,□) do rim de cão, por ubaína (●,○) e por PST 2238 (■,□) (adaptado de Ferrari *et al.*, 1998). Explicação no texto.**

Os ensaios de actividade enzimática revelaram que a ubaína inibe a hidrólise de ATP pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  para concentrações superiores a 1 nM, sendo caracterizada por um valor de  $\text{IC}_{50}$  de 25 nM e  $\text{IC}_{95}$  de 1  $\mu\text{M}$ . Relativamente ao PST 2238 verificou-se que também este composto é um inibidor da actividade hidrolítica de ATP da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , sendo o seu efeito inibitório caracterizado por um valor de  $\text{IC}_{50}$  de 25  $\mu\text{M}$ . No que respeita a interacção ligando-receptor, os ensaios de competição (determinação da capacidade de remoção do ligando previamente ligado ao receptor por outros ligandos) foram efectuados com recurso ao isótopo radioactivo de ubaína,  $^3\text{H}$ -ubaína. Este estudo revelou que o PST 2238 é um antagonista de ubaína, isto é, também se liga ao receptor de esteróides cardiotónicos ( $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ ). À semelhança do anteriormente descrito relativamente ao efeito dos dois compostos na actividade hidrolítica de ATP da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , também as concentrações necessárias para reduzir em 50% a ligação de  $^3\text{H}$ -ubaína à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  são distintas, nomeadamente os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram de 25 nM e 1,7  $\mu\text{M}$  para, respectivamente ubaína e PST 2238. Deste modo, parece evidente que a ubaína é tanto um inibidor como um ligando mais potente do que o PST 2238. Por outro lado, é interessante salientar que a actividade de receptor ocorre na presença de concentrações de ambos os compostos mais baixas do que as requeridas para inibir a actividade hidrolítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Por outro lado, a análise

comparativa dos resultados obtidos nos ensaios de competição com PST 2238 e ubaína na presença de diferentes concentrações de  $K^+$ , que podem favorecer a adopção de diferentes conformações da  $(Na^+/K^+)ATPase$  (ver página 6), evidenciaram diferenças significativas relativamente ao mecanismo de ligação destes compostos à  $(Na^+/K^+)ATPase$ . A ligação de PST 2238 à  $(Na^+/K^+)ATPase$  parece conduzir à formação de complexos ligando – receptor menos estáveis do que os formados na presença de ubaína. De facto, observou-se que tanto o processo de associação como o de dissociação do complexo PST 2238 -  $(Na^+/K^+)ATPase$  é cerca de 131 vezes mais rápido do que no caso do complexo ubaína -  $(Na^+/K^+)ATPase$  (Ferrari *et al.*, 1998).

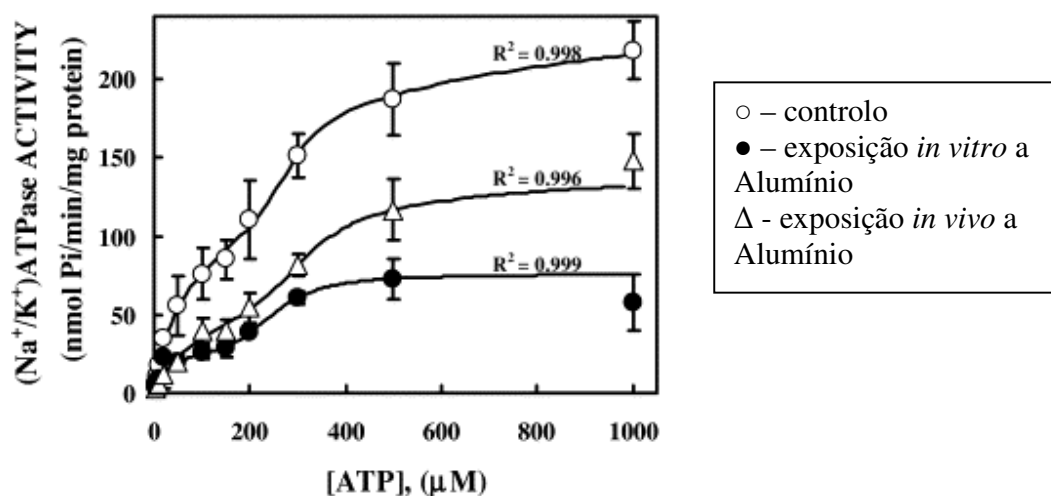
A acção do PST 2238 como antagonista dos receptores de esteróides cardiotónicos ( $(Na^+/K^+)ATPase$ ) foi posteriormente confirmada em ensaios *in vitro* (Ferrari *et al.*, 1998). Em cultura de células, a elevação da concentração de  $Na^+$  no interior das células de 140 nmol/mg de proteína (concentração basal) para 450 nmol/mg de proteína causou a activação máxima da “ bomba de  $Na^+$  e  $K^+$  “. Esta actividade enzimática foi prevenida por incubação das células durante 5 horas com ubaína ( $IC_{50} = 70 \mu M$ ), enquanto que PST2238 100  $\mu M$  não causou qualquer efeito. Porém, o PST 2238 (0,01 pM a 1 nM) previne o efeito da ubaína, tendo sido verificados níveis de actividade de  $(Na^+/K^+)ATPase$  idênticos aos registados em condições controlo após 5 dias de incubação das células na presença simultânea de PST 2238 1 nM e ubaína 10  $\mu M$  (Ferrari *et al.*, 1998).

## 2.3 Alumínio

O alumínio é o metal mais abundante da crosta terrestre. O isolamento do alumínio puro, isto é, do décimo terceiro elemento da tabela periódica teve lugar em 1827 e é geralmente atribuído a Wohler. O potencial neurotóxico do alumínio foi pela primeira vez evidenciado durante o século XIX por Orfila (1814) e por Siem (1885) (Döllken, 1897). Na realidade, a utilização de compostos de alumínio como coagulantes levaram à descoberta dos seus efeitos neurotóxicos no homem. Em 1897, Döllken verificou que a administração intracraniana de tartarato de alumínio no coelho provoca degeneração celular (Döllken, 1897).

O primeiro envenenamento humano foi relatado na revista Lancet em 1921 (Spofforth, 1921). Nos nossos dias, o alumínio é usado em muitos ramos da indústria. Os compostos mais usados são o óxido de alumínio e o sulfato de alumínio. Desde a primeira descrição da encefalopatia de diálise por Alfrey e colaboradores (Alfrey *et al.*, 1972, 1976) que o desenvolvimento desta doença em pacientes com insuficiência renal crónica tem sido atribuído à exposição a alumínio. De facto, o alumínio tem sido recorrentemente implicado no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, tais como as doenças de Alzheimer e de Parkinson (Yokel, 2000; Yokel *et al.*, 2001).

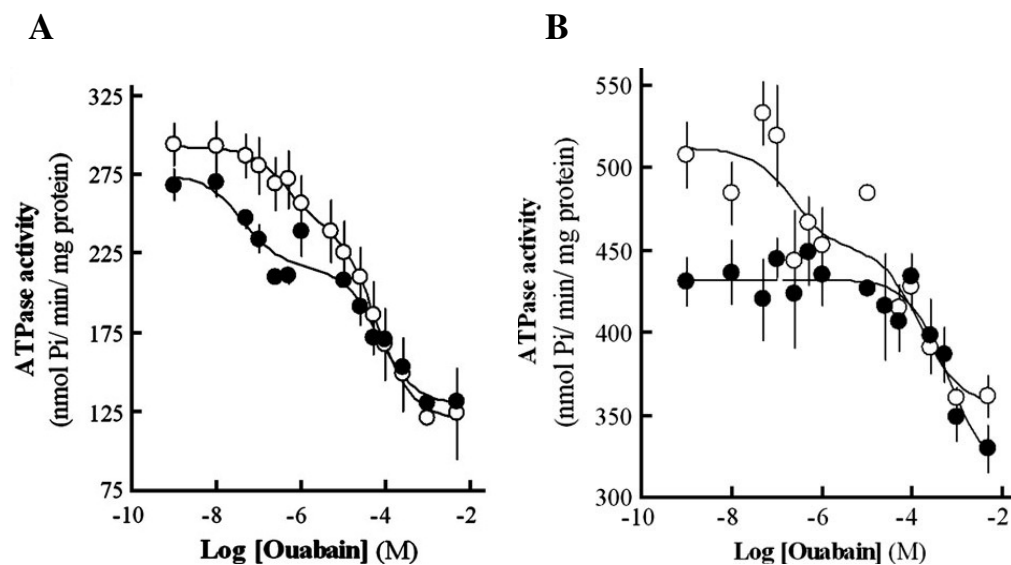
O(s) mecanismo(s) subjacentes ao(s) efeito(s) neurotóxico(s) do alumínio permanece(m) por esclarecer (Gonçalves & Silva, 2007). Várias têm sido as hipóteses avançadas para explicar as acções deletérias da exposição a alumínio a nível celular. Neste contexto, é curioso referir que os resultados obtidos em ensaios *in vivo* e *in vitro* sugerem frequentemente efeitos opostos ao nível dos mesmos alvos moleculares. No caso particular da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  tal situação parece não se verificar (Fig. 6). A actividade hidrolítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal é inibida por  $\text{AlCl}_3$  tanto em ensaios *in vitro* (realizados na presença de concentrações submilimolares de  $\text{AlCl}_3$ ) como em ensaios *in vivo*, isto é, quando a actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi avaliada na fracção sinaptossomal isolada a partir de ratos após exposição oral prolongada a  $\text{AlCl}_3$ . Em ambas as abordagens experimentais, o alumínio impede a activação adicional da actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  produzida pela ligação, de baixa afinidade, de ATP e consequente redução da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ .



**Figura 6 – Efeito da exposição a alumínio na dependência da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  em função da concentração de ATP** (Silva & Gonçalves , 2003). Explicação no texto.

O efeito inibitório do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  tem sido observado por vários investigadores (Caspers *et al*, 1990, 1993, 1994; Lal *et al*, 1993; Sarin *et al*, 1997a; Silva & Gonçalves, 2003; Silva *et al*, 2005). Vários mecanismos explicativos da acção inibitória do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foram avançados desde os anos oitenta do século XX. Parece consensual que a possibilidade de formação de complexos estáveis de  $\text{ATP-Al}^{3+}$  (Panchalingam *et al*, 1991; Rensburg *et al*, 1997) e consequente redução da concentração do substrato da enzima, o  $\text{ATP-Mg}^{2+}$ , pode justificar o efeito inibitório causado por exposição a elevadas concentrações de alumínio. Porém, Caspers e colaboradores (1990, 1993, 1994) verificaram que a inibição por concentrações micromolares de alumínio da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é caracterizada pela diminuição da velocidade máxima da hidrólise de ATP. Estes investigadores sugeriram que o alumínio promove a estabilização da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na forma fosforilada, potenciando a ligação da ubaína à enzima, ou seja, o alumínio pode actuar também como inibidor reversível não competitivo da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Tal como referido anteriormente (pág. 8), a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  possui uma estrutura quaternária complexa e as isozimas são caracterizadas por heterogeneidade estrutural e diferem tanto na sensibilidade a ubaína como no padrão de expressão em diferentes órgãos e tecidos (Shamraj *et al*, 1991; Stengelin *et al*, 1997; Dostanic-Larson *et al*, 2006). Silva e colaboradores (2005) verificaram

que a exposição oral e prolongada a  $\text{AlCl}_3$  induz a inibição das isozimas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sem alterar a expressão das isoformas da subunidade catalítica  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$  no cérebro e  $\alpha_1$  no rim. Por outro lado, o alumínio parece reduzir a actividade enzimática a concentrações submicromolares de ubaína (Fig. 7). A formação na membrana plasmática de estruturas oligoméricas constituídas por protómeros  $\alpha\beta$  parece conferir à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  a capacidade de activação adicional por altas concentrações de ATP (Maunsbach et al., 1991; Boldyrev, 2001; Taniguchi et al., 2001; Kaplan, 2002). Por conseguinte, também foi sugerido que a exposição a alumínio pode causar a diminuição do grau de oligomerização da enzima, diminuindo o número de protómeros que constituem a estrutura oligomérica da proteína integrada na membrana sinaptossomal, visto que concentrações submilimolares de alumínio apenas impedem a activação adicional da actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  produzida pela ligação, de baixa afinidade, de ATP (Fig.6 e Silva & Gonçalves, 2003). Os mecanismos enunciados parecem revelar aspectos complementares da acção do alumínio que podem contribuir para o seu efeito inibitório na actividade hidrolítica de ATP da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Neste contexto é importante referir que vários investigadores sugeriram que os efeitos induzidos por alumínio ao nível da composição lipídica e fluidez da membrana plasmática e da intensificação da peroxidação lipídica e proteica também podem causar a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Gutteridge *et al*, 1985; Sarin *et al*, 1997).



**Figura 7 – Efeito da exposição crónica a alumínio (●) e controlo (○), na actividade de ATPase sinaptossomal (Painel – A) e renal (Painel – B) (adaptado de Silva *et al*, 2005). Explicação no texto.**

### 3- Objectivos

Os sintomas clínicos da intoxicação por alumínio apontam para uma elevada vulnerabilidade do sistema nervoso central relativamente a este metal (Kerr & Ward, 1988). A acção neurotóxica do alumínio é apenas parcialmente compreendida à luz dos mecanismos explicativos dos seus efeitos deletérios ao nível de alguns alvos moleculares.

Ao longo dos últimos anos tem sido observado por diversos investigadores o efeito inibitório do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Sendo esta entidade molecular de elevada importância para o funcionamento das células nervosas (Jorgensen *et al*, 2003) é importante caracterizar e explicar a acção inibitória do alumínio na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ .

Em 1997 foi sintetizado, no *PRASSIS Istituto Ricerche Sigma-Tau S.p.A*, um novo composto anti-hipertensivo, o PST 2238, cujo mecanismo de acção envolve a interacção com a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Quadri *et al*, 1997; Ferrari *et al*, 1998, 1999). No âmbito do presente trabalho, interessa salientar algumas das propriedades deste composto, nomeadamente o facto de ser um inibidor não competitivo da actividade hidrolítica de ATP da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Ferrari *et al*, 1998, 1999) e um antagonista dos receptores de esteróides cardiotónicos ( $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ ) capaz de competir com a ubaína na ligação à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Ferrari *et al*, 1999). Pretendendo o presente trabalho contribuir para o esclarecimento do(s) mecanismo(s) responsáveis pelos efeitos neurotóxicos do alumínio, a disponibilização do composto PST 2238 pelo *PRASSIS Istituto Ricerche Sigma-Tau S.p.A* ao nosso laboratório para realização de ensaios *in vitro* possibilitou iniciar o estudo comparativo dos efeitos do alumínio e do PST 2238 na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal. Os trabalhos anteriormente realizados por diversos investigadores (Ferrari *et al*, 1998, 1999; Caspers *et al*, 1990, 1993, 1994; Silva & Gonçalves, 2003; Silva *et al*, 2007) sugerem que os efeitos de ambos os compostos na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  possuem características comuns, nomeadamente o alumínio e o PST 2238 parecem ser inibidores não-competitivos da actividade hidrolítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  e simultaneamente antagonistas da ubaína, interferindo com a ligação de alta-afinidade da ubaína à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Os modelos e condições experimentais usados nos estudos supramencionados foram diversos, nomeadamente os efeitos do PST 2238 reportam-se à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  purificada a partir da medula renal de cão, enquanto que os do alumínio

foram maioritariamente descritos usando a fracção sinaptossomal preparada a partir de córtex cerebral de rato. Por conseguinte, o principal objectivo do presente trabalho consistiu em verificar se o PST 2238 é um inibidor da actividade hidrolítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  presente na fracção sinaptossomal preparada a partir de córtex cerebral de rato.

O PST 2238 é um composto de baixa solubilidade em meio aquoso, pelo que inicialmente se procedeu ao estudo do efeito do solvente utilizado, dimetilsulfóxido (DMSO), na actividade hidrolítica de ATP da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Em virtude do PST 2238 competir com a ubaína na ligação para os locais de ligação presentes na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  renal de cão e sendo a ubaína usada para distinguir a actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  das demais actividades hidrolíticas de ATP presentes na fracção sinaptossomal, procedeu-se também à verificação da viabilidade de utilização de ubaína como inibidor selectivo na medição da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na presença de PST 2238. O efeito do PST 2238 na actividade hidrolítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  presente na fracção sinaptossomal preparada a partir de córtex cerebral de rato foi estudado em ensaios de actividade enzimática na ausência e na presença de concentrações crescentes do composto. Finalmente, foram ainda realizados alguns ensaios preliminares de actividade enzimática na presença simultânea de PST 2238 e  $\text{AlCl}_3$  para despiste de relações de sinergismo, potenciação ou antagonismo entre os efeitos causados por estes dois compostos na actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  de sinaptossomas isolados a partir do córtex cerebral de rato.





## II – Material e Métodos

## 1 - Soluções

Os meios de reacção utilizados nos ensaios foram preparados a partir de soluções de reserva obtidas por dissolução dos respectivos reagentes para fins analíticos em água desionizada. O ATP, na forma de sal de magnésio, foi dissolvido em água desionizada e o pH ajustado a 7,4 com Tris. As soluções de reserva de Mg-ATP e de ubaína foram conservadas a -20°C, enquanto que as soluções de AlCl<sub>3</sub> e de PST 2238 foram preparadas diariamente por dissolução dos compostos em, respectivamente, água desionizada e meio de reacção contendo DMSO a 10%.

## 2 - Preparação do Material Biológico

A fracção sinaptossomal foi obtida a partir do córtex cerebral de ratos machos adultos, segundo o método descrito por Hájos (1975) e modificado por Carvalho e Carvalho (1979).

Os ratos Wistar, fornecidos pela Harlan Inerfauna Ibérica, S.L, foram mantidos em gaiolas numa câmara “Flufrance – A 130SN – Rech” com humidade (50±10%) e temperatura (20±1°C) controladas. Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração “Panlab AO4” e água potável.

Os ratos foram sacrificados por distensão cervical, seguida de decapitação. Após remoção do cerebelo, o cérebro foi dissecado segundo o sulco inter-hemisférico para permitir a ablação das regiões hipocampais e estreadotalâmicas, bem como para facilitar a separação das meninges e massa branca.

O tecido obtido foi fragmentado e homogeneizado em nove volumes de sacarose 0,32 M e HEPES-Tris 10 mM a pH 7,4. As homogeneizações foram efectuadas num homogeneizador de vidro do tipo “Potter-Elvehjem” com pistão de Teflon, rodando a 600 rotações por minuto. Estas operações foram realizadas à temperatura de 0 a 4 °C.

O homogeneizado de córtex cerebral foi submetido a uma série de centrifugações diferenciais sempre à temperatura de 4°C. A primeira centrifugação foi realizada a 1.500xg durante 10 minutos. O sedimento obtido foi desprezado, em virtude de ser essencialmente constituído por células intactas, glóbulos vermelhos e núcleos. O sobrenadante da

centrifugação anterior foi centrifugado a 9.000xg durante 20 minutos. O sedimento, que contém a fracção sinaptossomal não purificada, após ressuspensão em sacarose 0,32 M e HEPES-Tris 10 mM a pH 7,4, foi aplicado sobre uma coluna de sacarose 0,8 M previamente preparada nos tubos de centrifugação. Após centrifugação (9.000xg durante 20 minutos) em gradiente descontínuo de sacarose, a fracção sinaptossomal encontra-se dispersa na camada de sacarose 0,8 M. Esta fracção foi recolhida, diluída em igual volume de água desionizada e centrifugada a 20.000xg durante 30 minutos. Por fim, procedeu-se à ressuspensão do sedimento resultante em sacarose 0,32 M e HEPES-Tris 10 mM a pH 7,4. As fracções sinaptossomais obtidas foram congeladas e mantidas a -80 °C até utilização.

### **3 – Determinação da concentração de proteína**

A determinação da concentração de proteína das preparações de sinaptossomas foi efectuada segundo o método colorimétrico descrito por Layne (1957).

Para quantificar a concentração proteica das amostras, as reacções do biureto foram sempre efectuadas paralelamente com alíquotas das fracções sinaptossomais e com padrões de albumina sérica bovina (10 e 20 mg de proteína/ml). Alíquotas (50 µl) e padrões foram solubilizados com 50 µl de SDS a 10 % e a reacção colorimétrica foi iniciada com a adição de 2 ml de reagente de biureto (sulfato de cobre hidratado a 0,15 %, tartarato de sódio e potássio a 0,6 %, hidróxido de sódio a 3 % e iodeto de potássio a 0,1 %). As reacções decorreram durante 15 minutos. As absorvências foram determinadas ao comprimento de onda de 540 nm num espectrofotómetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14P”.

Os valores de concentração de proteína das amostras foram obtidos por interpolação após traçado da recta de calibração.

### **4 – Determinação da actividade de ATPase**

Os ensaios de actividade de ATPase da fracção sinaptossomal decorreram a 35°C em banho seco, com agitação constante. Alíquotas da fracção sinaptossomal (concentração final de 1 mg de proteína/ml) foram adicionadas aos meios de reacção contendo NaCl 128

mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EGTA 0,1 mM e HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) e suplementados com as substâncias testadas na concentração desejada. As reacções foram iniciadas após 15 minutos de incubação pela adição de Mg-ATP 1 mM (concentração final). Decorridos 5 minutos, as reacções foram finalizadas pela adição de 250 µl de TCA a 20 % arrefecido e posterior colocação dos tubos em gelo. Os sobrenadantes, colectados após centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos, foram utilizados para quantificação do fosfato inorgânico produzido durante a reacção enzimática, segundo o método descrito por Bartlett (1959).

As reacções colorimétricas, iniciadas pela adição de reagente de molibdato (sulfato ferroso a 5 % e molibdato de amónio a 1 % preparado em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N), decorreram durante 15 minutos à temperatura ambiente. Soluções de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, de concentração conhecida, foram processadas em simultâneo para obtenção da recta de calibração. As absorvências foram determinadas ao comprimento de onda de 600 nm num espectrofotómetro UV/VIS “Perkin-Elmer, modelo Lambda 14P”. Os valores de concentração de fosfato inorgânico das amostras foram obtidos por interpolação após traçado da recta de calibração.

A actividade de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase foi distinguida das demais actividades hidrolíticas de ATP com recurso ao seu inibidor selectivo, a ouabaina.

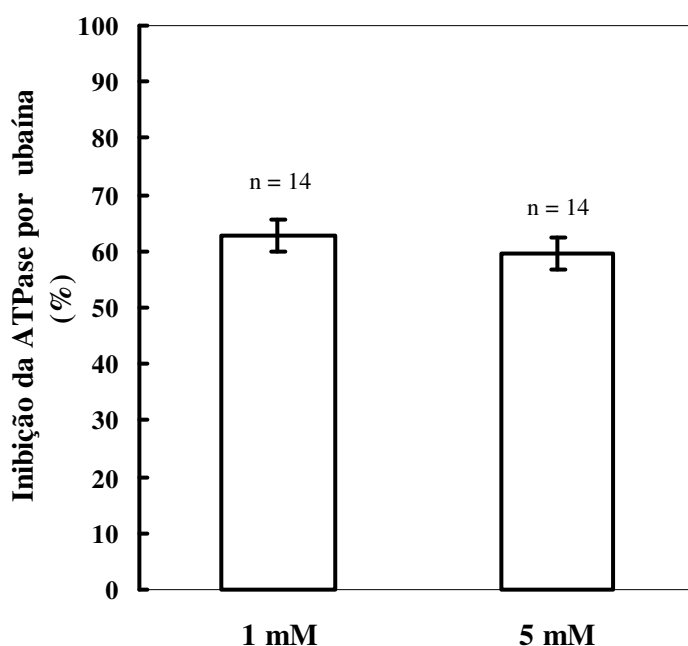
## 5 – Análise de dados

Os resultados apresentados representam a média  $\pm$  o erro padrão da média do número de experiências (n) indicado nas legendas das respectivas figuras. A comparação entre grupos de médias dos tratamentos foi efectuada pelo teste *t de Student*. As diferenças foram consideradas significativas para um nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

### III – Resultados e Discussão

O principal objectivo deste trabalho consistiu em verificar se o PST 2238 é um inibidor da actividade hidrolítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  presente na fracção sinaptossomal preparada a partir de córtex cerebral de rato. Para o efeito, foram utilizados, após congelamento em azoto líquido e descongelamento à temperatura ambiente, sinaptossomas isolados a partir de córtex cerebral de ratos Wistar, um modelo experimental muito usado em neurotoxicologia. Sinaptossoma é a designação dada à fracção subcelular constituída pelo terminal pré-sináptico intacto que, por possuir certo grau de autonomia metabólica, funciona como uma “mini-célula” durante algum tempo após o seu isolamento (Nicholls, 1989). O centro catalítico da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  não é acessível ao ATP extracelular, pois a membrana pré-sináptica é impermeável a ATP e o local de ligação deste substrato encontra-se exposto ao espaço intracelular. Por conseguinte, procedeu-se à prévia permeabilização da membrana sinaptossomal por congelamento/descongelamento, o que permite quantificar a actividade hidrolítica de ATP pela fracção sinaptossomal em condições de concentração inicial de ATP controladas. Os ensaios de actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foram realizados de acordo com metodologia já anteriormente utilizada no laboratório. Nas condições experimentais usadas neste trabalho, a actividade hidrolítica de ATP da fracção sinaptossomal é constante durante o tempo de reacção (5 min) e directamente proporcional à concentração de proteína da preparação biológica no meio de reacção (0,1 mg de proteína/ml).

Tal como se pode observar na Fig. 8, na presença da concentração de Mg-ATP saturante (1 mM), a percentagem de actividade hidrolítica de ATP da fracção sinaptossomal não inibida por ubaína (1 mM) permaneceu praticamente inalterada quando a concentração deste inibidor selectivo da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  no meio de reacção quintuplicou (5 mM). Tanto a actividade hidrolítica de ATP da fracção sinaptossomal ( $406 \pm 36$  nmol Pi / min / mg de proteína ;  $n = 28$ ) como a percentagem desta actividade não inibida por ubaína 1 mM ( $63 \pm 3$  %;  $n = 14$ ) ou por ubaína 5 mM ( $60 \pm 3$  %;  $n = 14$ ) são concordantes com os obtidos em trabalhos anteriores (Silva & Gonçalves, 2003). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas ( $p = 0.4589$ ) nas percentagens de inibição da actividade hidrolítica de ATP na presença das duas concentrações testadas, respectivamente 1 mM e 5 mM. Por conseguinte, a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi calculada como a diferença entre a actividade de ATPase na ausência e na presença de ubaína 1 mM, e esta concentração de ubaína foi usada em todos os ensaios posteriores.



**Figura 8 – A actividade ATPásica sinaptossomal é inibida por ubaína**

Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) foram incubados durante 15 minutos à temperatura de 35 °C, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) na ausência e na presença de ubaína 1 mM e 5 mM. As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP (concentração final no meio de reacção igual a 1 mM). A reacção foi finalizada após 5 minutos com a adição de TCA a 20% e o P<sub>i</sub> foi quantificado tal como descrito em “Materiais e métodos”. Os valores, em percentagem da actividade ATPásica total, são apresentados como a média ± o erro padrão de 14 determinações independentes.

### **1 - A actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase sinaptossomal não é alterada na presença de DMSO a 5 %**

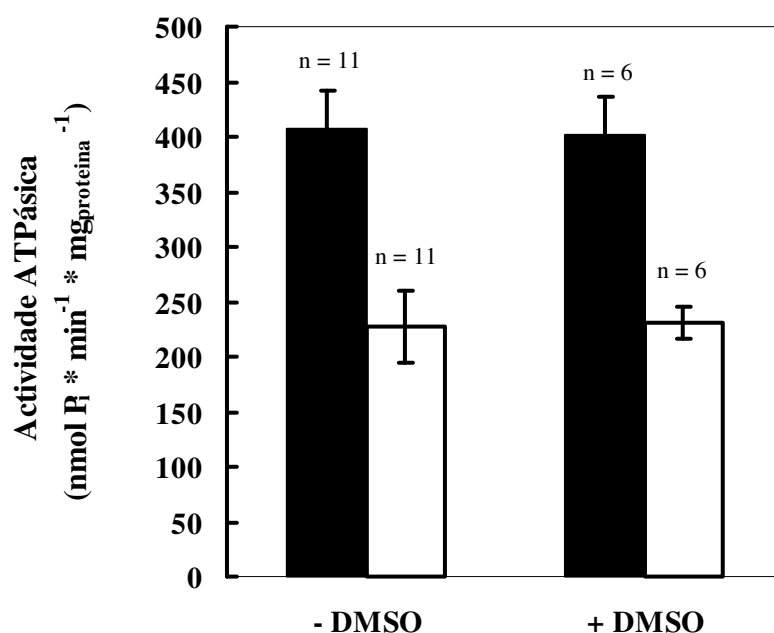
O PST 2238 é um composto praticamente insolúvel em soluções aquosas como as utilizadas para avaliar a actividade de (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. De acordo com as informações fornecidas pelo laboratório *PRASSIS Istituto Ricerche Sigma-Tau S.p.A*, este composto deve ser inicialmente solubilizado em DMSO e posteriormente diluído em meio salino.

O DMSO (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO) é um solvente orgânico de elevada capacidade hidrofóbica, pois possui elevada afinidade pelo hidrogénio, formando pontes mais fortes que as formadas entre moléculas de água. O DMSO pode interagir com várias biomoléculas,

nomeadamente com as proteínas e alterar a sua configuração molecular. A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é uma enzima cuja actividade é alterada por DMSO (Chiou & Vesely, 1995). Por conseguinte, a actividade hidrolítica de ATP foi quantificada na presença de DMSO a 5%, que corresponde à concentração máxima de DMSO presente no meio de reacção em consequência da sua utilização como solvente do PST 2238.

Como se pode observar na Fig. 9, a actividade ATPásica na ausência e na presença de ubaína é muito semelhante, tanto no meio com DMSO como no meio sem DMSO. Na ausência de ubaína, a actividade enzimática registada foi de  $408 \pm 34$  nmol  $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$  de proteína em meio sem DMSO ( $n = 11$ ) e de  $401 \pm 35$  nmol  $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$  de proteína em meio com DMSO ( $n = 6$ ). Na presença de ubaína, os valores obtidos foram, respectivamente,  $228 \pm 33$  nmol  $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$  de proteína em meio sem DMSO ( $n = 11$ ) e de  $231 \pm 15$  nmol  $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$  de proteína em meio com DMSO ( $n = 6$ ).





**Figura 9 - O DMSO a 5 % não altera a actividade ATPásica sinaptossomal.**

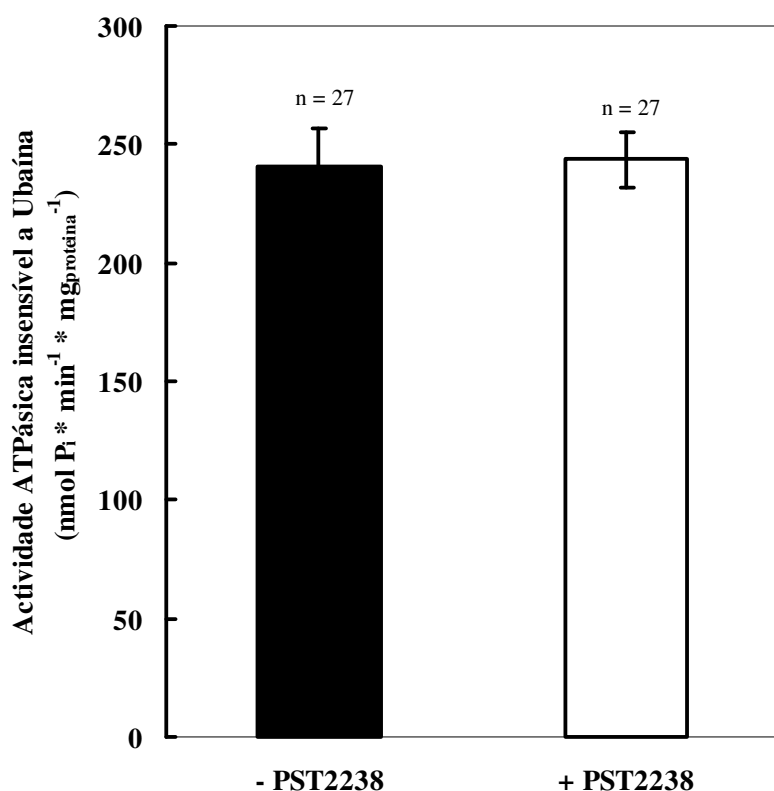
Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) foram incubados durante 15 minutos à temperatura de 35 °C, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) na ausência (■) e na presença (□) de ubaína 1 mM e em meio sem e com DMSO a 5%. As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP (concentração final no meio de reacção igual a 1 mM). A reacção foi finalizada após 5 minutos com a adição de TCA a 20% e o P<sub>i</sub> foi quantificado tal como descrito em “Materiais e métodos”. Os valores da actividade ATPásica são expressos em nmol P<sub>i</sub>/min/mg de proteína e são apresentados como a média ± o erro padrão de 11 determinações independentes em meio sem DMSO e 6 determinações independentes em meio com DMSO.

## 2 - O PST 2238 inibe a (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase sinaptossomal

De acordo com os estudos realizados por Ferrari e colaboradores (Ferrari *et al*, 1998) numa preparação de (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase purificada a partir da medula renal de cão, o PST 2238 é um antagonista selectivo da ubaína. No nosso trabalho a ubaína foi usada para discriminar a actividade de (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase das demais actividades hidrolíticas de ATP presentes na fracção sinaptossomal. Por conseguinte, primeiramente foi realizado um

conjunto de ensaios para verificar se o PST 2238 interferia com a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  por ubaína 1 mM.

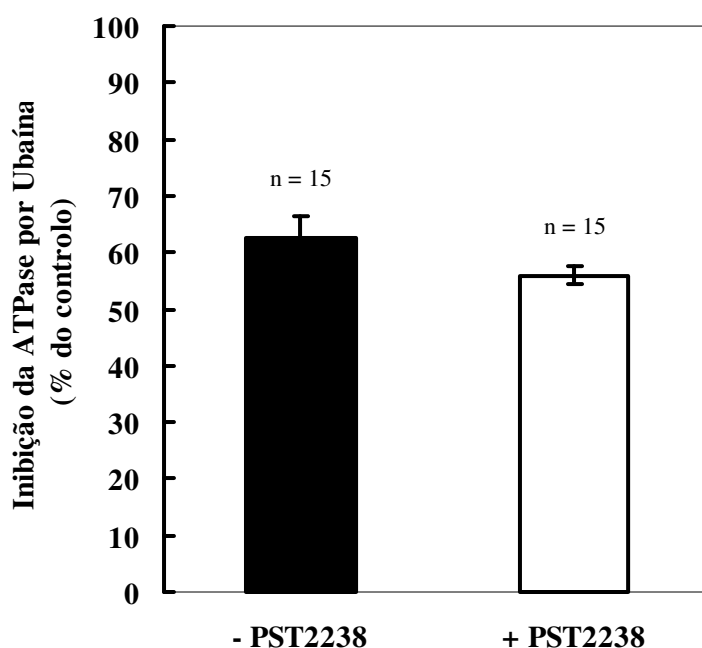
Na fig. 10 está representada a actividade ATPásica insensível à ubaína na ausência e na presença de PST 2238 90  $\mu\text{M}$ . Esta concentração corresponde à concentração de PST 2238 mais elevada das utilizadas nos ensaios devido à reduzida solubilidade do composto no meio de reacção.



**Figura 10 - O PST 2238 não altera a actividade ATPásica sinaptossomal na presença de ubaína 1 mM.**

Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) foram incubados durante 15 minutos à temperatura de 35 °C, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) e ubaína 1mM na ausência (■) e na presença (□) de PST 2238 90  $\mu\text{M}$ . As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP (concentração final no meio de reacção igual a 1 mM). A reacção foi finalizada após 5 minutos com a adição de TCA a 20% e o  $\text{P}_i$  foi quantificado tal como descrito em “Materiais e métodos”. Os valores da actividade da ATPase na presença de ubaína são expressos em nmol  $\text{P}_i$ /min/mg de proteína e são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 27 determinações independentes.

A actividade ATPásica sinaptossomal registada na presença de ubaína 1 mM ( $240 \pm 16$  nmol  $P_i$ /min/mg de proteína;  $n = 27$ ) permaneceu inalterada ( $p = 0.8745$ ) quando os ensaios foram realizados na presença simultânea de ubaína 1 mM e PST 2238 90  $\mu$ M ( $244 \pm 12$  nmol  $P_i$ /min/mg de proteína;  $n = 27$ ). Nas condições experimentais usadas, o PST 2238 não parece antagonizar a inibição da  $(Na^+/K^+)ATPase$  por ubaína 1 mM, tal como se pode observar na Fig. 11.



**Figura 11 – O PST 2238 não modifica a inibição máxima da ATPase sinaptossomal por ubaína.**

Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) foram incubados durante 15 minutos à temperatura de 35 °C, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM,  $MgCl_2$  3 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) e ubaína 1mM na ausência (■) e na presença (□) de PST 2238 90  $\mu$ M. As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP (concentração final no meio de reacção igual a 1 mM). A reacção foi finalizada após 5 minutos com a adição de TCA a 20% e o  $P_i$  foi quantificado tal como descrito em “Materiais e métodos”. Os valores da inibição por ubaína são expressos em percentagem relativamente ao respectivo controlo (ausência de ubaína e de PST 2238) e são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 15 determinações independentes.

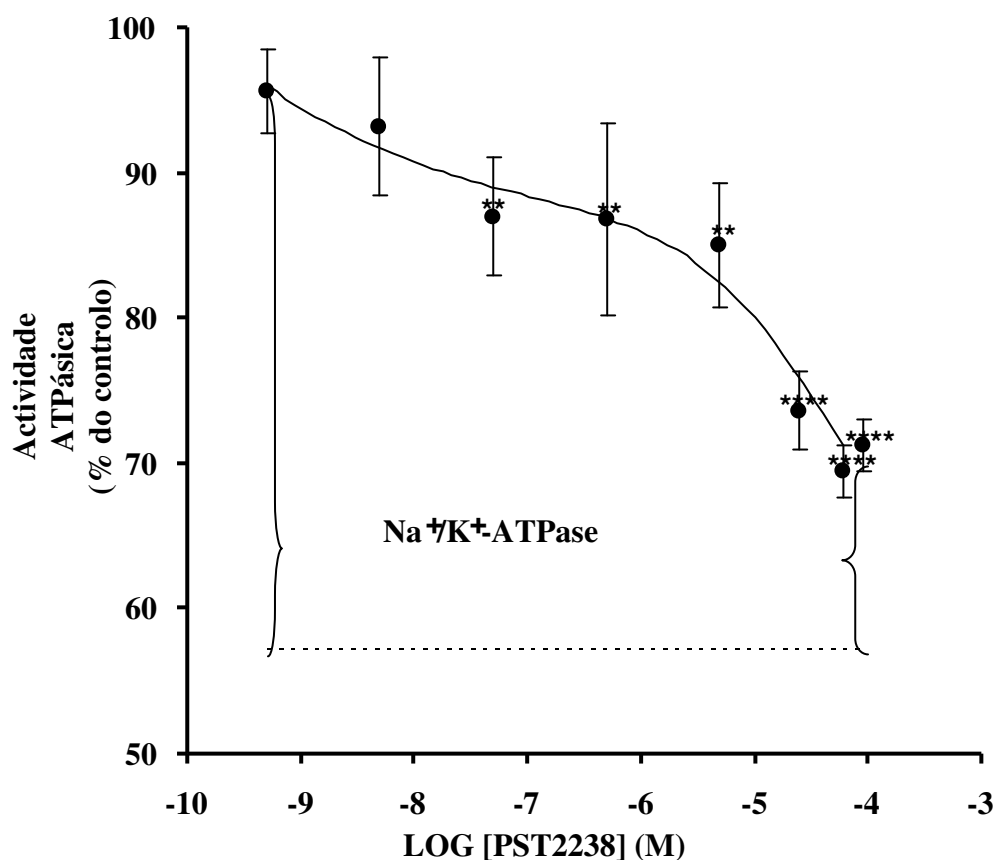
Os ensaios de actividade enzimática renal revelaram que a ubaína inibe a hidrólise de ATP pela  $(Na^+/K^+)ATPase$  para concentrações superiores a 1 nM, sendo caracterizada por um valor de  $IC_{50}$  de 25 nM e  $IC_{95}$  de 1  $\mu$ M (Ferrari *et al*, 1998). Relativamente ao PST

2238 verificou-se que também este composto é um inibidor da actividade hidrolítica de ATP da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , sendo o seu efeito inibitório caracterizado por um valor de  $\text{IC}_{50}$  de 25  $\mu\text{M}$  (Ferrari *et al*, 1998). No que respeita a interacção ligando-receptor, os ensaios de competição foram efectuados com recurso ao isótopo radioactivo de ubaína,  $^3\text{H}$ -ubaína (Ferrari *et al*, 1998). Este estudo revelou que o PST 2238 é um antagonista de ubaína, isto é, também se liga ao receptor de esteróides cardiotónicos  $((\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase})$ . À semelhança do anteriormente descrito relativamente ao efeito dos dois compostos na actividade hidrolítica de ATP da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , também as concentrações necessárias para reduzir em 50% a ligação de  $^3\text{H}$ -ubaína à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  são distintas, nomeadamente os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram de 25  $\mu\text{M}$  e 1,7  $\mu\text{M}$  para, respectivamente PST 2238 e ubaína. Deste modo, parece evidente que a ubaína é tanto um inibidor como um ligando mais potente do que o PST 2238. Por outro lado, a análise comparativa dos resultados obtidos nos ensaios de competição com PST 2238 e ubaína na presença de diferentes concentrações de  $\text{K}^+$ , que podem favorecer a adopção de diferentes conformações da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (ver página 6), evidenciaram diferenças significativas relativamente ao mecanismo de ligação destes compostos à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . A ligação de PST 2238 à  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  parece conduzir à formação de complexos ligando – receptor menos estáveis do que os formados na presença de ubaína. De facto, observou-se que tanto o processo de associação como o de dissociação do complexo PST 2238 -  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é cerca de 131 vezes mais rápido do que no caso do complexo ubaína -  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (Ferrari *et al.*, 1998). Porém, o PST 2238 (0,01 pM a 1 nM) parece também prevenir o efeito da ubaína 1 nM na actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  após incubação prolongada de culturas celulares na presença de ambos os compostos (Ferrari *et al*, 1998). O PST 2238 tem a capacidade de, selectivamente, remover a ubaína da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  *in vitro* em concentrações micromolares.

Os resultados obtidos sugerem que, à semelhança do anteriormente estabelecido para a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  renal, o PST 2238 não antagoniza a inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal por concentrações milimolares de ubaína.

O PST 2238, para além de deslocar a ubaína dos locais ligação de alta afinidade presentes na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  renal ( $\text{IC}_{50} = 1,7 \mu\text{M}$ ), também inibe a sua actividade hidrolítica de ATP quando presente em concentrações mais elevadas ( $\text{IC}_{50} = 25 \mu\text{M}$ )

(Ferrari *et al*, 1998). O gráfico apresentado na Fig. 12 mostra o efeito de concentrações crescentes de PST 2238 na actividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase sinaptossomal.



**Figura 12 – A inibição da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase sinaptossomal por PST 2238 é dependente de concentração.**

Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) foram incubados durante 15 minutos à temperatura de 35 °C, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) e concentrações crescentes de PST 2238 ( $5 \times 10^{-10}$  -  $9 \times 10^{-5}$  M) (●-●). As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP (concentração final no meio de reacção igual a 1 mM). A reacção foi finalizada após 5 minutos com a adição de TCA a 20% e o  $\text{P}_i$  foi quantificado tal como descrito em “Materiais e métodos”. Simultaneamente foram também realizados ensaios na ausência de PST 2238 tanto na ausência como na presença de ubaína 1 mM. A linha a tracejado representa a percentagem de actividade ATPásica insensível a ubaína. Os valores da actividade ATPásica são expressos em percentagem relativamente ao respectivo controlo (ausência de ubaína e de PST 2238) e são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 8 determinações independentes. \*\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,02$ .

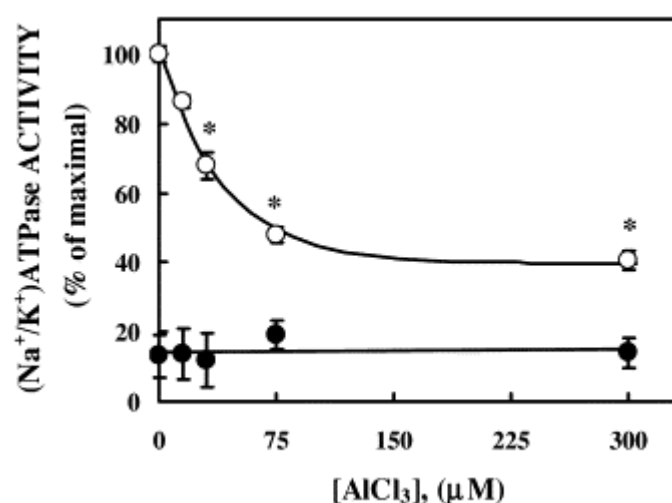
Na gama de concentrações testadas (0,5 nM - 90  $\mu$ M) o PST 2238 reduziu a actividade ATPásica sinaptossomal duma maneira dependente de concentração. Esta redução de actividade enzimática foi interpretada como reflectindo a acção inibitória do PST 2238 na ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase, visto que este composto não parece interferir com a inibição da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase sinaptossomal por concentrações milimolares de ubaína (Figs. 10 e 11). Para concentrações de PST 2238 superiores a 60  $\mu$ M foi observado um efeito inibitório máximo (70 %) da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase, já que aumentando a concentração do composto 1,67 vezes (100  $\mu$ M) não se verificou aumento do grau de inibição da actividade enzimática (63 %;  $n = 3$ ). A dependência da inibição da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase sinaptossomal por PST 2238 parece ser bifásica. Na gama de concentrações inferiores a 50 nM registou-se um decréscimo mais acentuado da actividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase. De facto, na presença de PST 2238 50 nM o efeito inibitório observado (30%) corresponde a ~ 43% do efeito inibitório máximo (70 %) registado para concentrações superiores a 60  $\mu$ M. Curiosamente, não se verificou grande alteração do grau de inibição da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase na gama de concentrações entre 50 nM (30 % de inibição) e 5  $\mu$ M (35 % de inibição). Por outro lado, para concentrações de PST 2238 superiores a 5  $\mu$ M voltou a ser observado um decréscimo da actividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase em função da concentração do composto, mas menos acentuado do que o registado na gama de concentrações inferiores a 50 nM. Os resultados obtidos sugerem que o efeito inibitório do PST 2238 na ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase sinaptossomal é mediado por ligação do PST 2238 à ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase com afinidades diferentes.

Tal como referido anteriormente, o PST 2238 inibe a ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase renal apenas para concentrações superiores a 10  $\mu$ M, sendo este efeito caracterizado por um valor de  $IC_{50}$  igual a 25  $\mu$ M (Ferrari *et al*, 1998). Por outro lado, o grau de inibição máximo determinado experimentalmente por Ferrari e colaboradores (1998) é de ~ 65% e foi obtido na presença de PST 2238 100  $\mu$ M. Por conseguinte, a análise comparativa dos resultados obtidos relativamente ao efeito do PST 2238 na ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase renal e sinaptossomal parecem indicar que sensibilidade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase presente nestas preparações é distinta. O efeito inibitório do PST 2238 na gama de concentrações inferiores a 5  $\mu$ M apenas foi observável na ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase sinaptossomal. Esta diferença poderá, eventualmente, ser justificada pela diferente composição em isozimas das duas preparações biológicas.

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  renal é caracterizada por só possuir a isoforma  $\alpha_1$  da subunidade catalítica (Ferrari *et al*, 1998), o que contribui para que esta isozima possua uma sensibilidade a ubaína reduzida. Pelo contrário, a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal tem na sua constituição as três isoformas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , e  $\alpha_3$  que apresentam sensibilidades diferente à ubaína, sendo a mais sensível a  $\alpha_3$  e a menos sensível a  $\alpha_1$  (Silva *et al*, 2005).

### 3 – Efeito do alumínio na inibição da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ por PST 2338

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal é inibida por  $\text{AlCl}_3$ , como se pode observar na Fig. 13. A inibição por  $\text{AlCl}_3$  na gama de concentrações submilimolares é apenas parcial e requer elevadas concentrações de ATP. Na presença de Mg-ATP 500  $\mu\text{M}$ , que corresponde à concentração de substrato saturante, a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é inibida maximamente (~ 60 %) para concentrações de  $\text{AlCl}_3$  superiores a 150  $\mu\text{M}$ .



**Figura 13 – Efeito da exposição *in vitro* a alumínio na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal (adaptado de Silva & Gonçalves, 2003).**

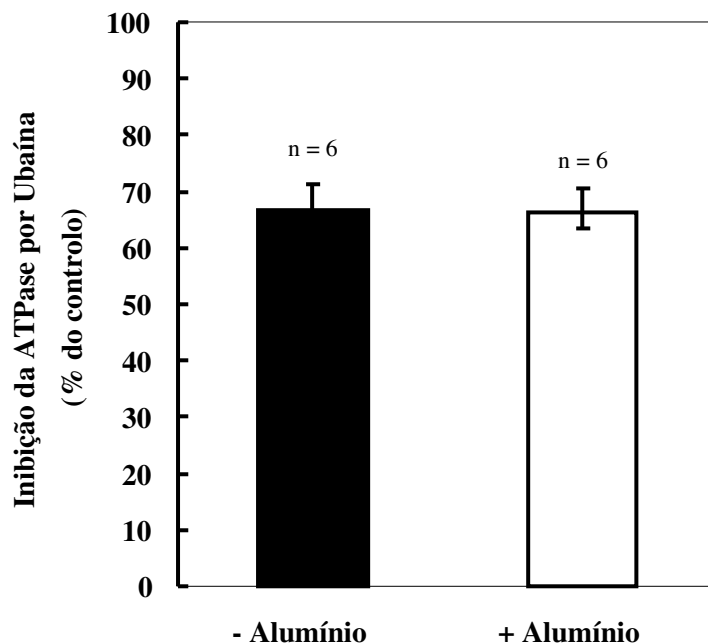
Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) foram incubados durante 5 minutos à temperatura de 35 °C, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) na ausência e na presença de concentrações crescentes de  $\text{AlCl}_3$  (0-300  $\mu\text{M}$ ). As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP de forma a obter uma concentração final de 500  $\mu\text{M}$  (○) ou de 5  $\mu\text{M}$  (●). As reacções foram finalizadas após 5 minutos e a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  foi quantificada tal como descrito em “Materiais e métodos”. Os valores da actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  são expressos em percentagem e são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 6 determinações independentes. \* $p < 0,01$ .

Os resultados obtidos neste trabalho (Fig. 12) e em trabalhos anteriores (Ferrari *et al*, 1998; Silva & Gonçalves, 2003; Silva *et al.*, 2005) permitem afirmar que o PST 2238 e o alumínio são inibidores da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase sinaptossomal. Curiosamente, ambos os compostos, na gama de concentrações usadas, apenas inibem parcialmente esta actividade enzimática, respectivamente ~70 % ([PST 2238] > 60 µM) e ~60% ([AlCl<sub>3</sub>] > 150 µM). Por outro lado, a exposição *in vivo* a alumínio promove inibição da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase sinaptossomal e renal (Silva & Gonçalves, 2003). Silva e colaboradores (2005) observaram que a diminuição da actividade de (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase induzida por exposição *in vivo* a AlCl<sub>3</sub> é assegurada pela inibição parcial das isozimas que contêm as subunidades catalíticas α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub> e α<sub>3</sub>, ocorrendo redução da sensibilidade da actividade enzimática a concentrações submicromolares de ubaína. Tal como referido anteriormente, o PST 2238, desloca a ubaína dos locais ligação de alta afinidade presentes na (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase renal (Ferrari *et al*, 1998). Em suma, nas condições experimentais usadas neste estudo os efeitos inibitórios de ambos os compostos na (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase parecem possuir características comuns, nomeadamente a promoção de inibição parcial da actividade hidrolítica da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase e a interferência com a ligação de alta-afinidade da ubaína à (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. O estabelecimento de relações de sinergismo, potenciação ou antagonismo entre os efeitos causados por PST 2238 e AlCl<sub>3</sub> na actividade de (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase sinaptossomal permitirá a formulação de novas hipóteses explicativas do(s) mecanismo(s) de acção neurotóxica do alumínio. O mecanismo de acção do PST 2238 como agente anti-hipertensivo tem vindo a ser caracterizado como capaz de antagonizar o aumento da pressão sanguínea e a actividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase renal, em condições de hipertensão, induzida pela exposição crónica a doses reduzidas de ubaína (Ferrari *et al*, 1998).

Como se pode observar na Fig. 14 e à semelhança do PST 2238 (Figs. 10 e 11), também AlCl<sub>3</sub> 300 µM não modificou a sensibilidade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase sinaptossomal a ubaína 1 mM nas condições experimentais usadas. Esta concentração de AlCl<sub>3</sub> corresponde à concentração utilizada nos ensaios subsequentes por garantir a observação do efeito inibitório máximo da actividade de (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase na gama de concentrações submilimolares (Fig. 13 e Silva & Gonçalves, 2003). Também nesta série de ensaios, a percentagem de actividade ATPásica sinaptossomal insensível a ubaína 1 mM (67 ± 5 %;



$n = 6$ ) permaneceu inalterada ( $p = 0.9926$ ) quando  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  foi adicionado ao meio de reacção ( $66 \pm 4 \%$ ;  $n = 6$ ).

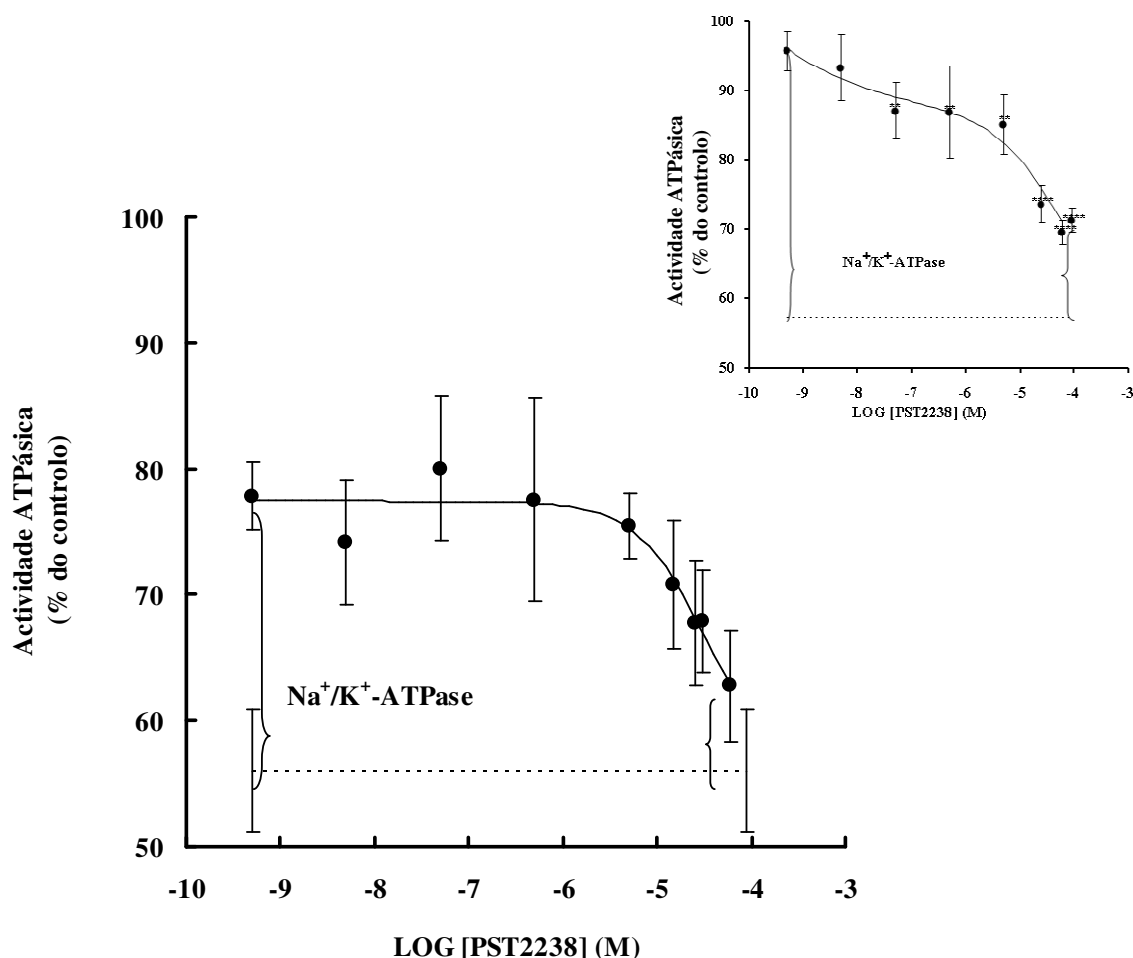


**Figura 14 - O  $\text{AlCl}_3$  não modifica a inibição máxima da ATPase sinaptossomal por ubaína.**

Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) foram incubados durante 15 minutos à temperatura de 35 °C, num meio contendo NaCl 128 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) e ubaína 1mM na ausência (■) e na presença (□) de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ . As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP (concentração final no meio de reacção igual a 1 mM). A reacção foi finalizada após 5 minutos com a adição de TCA a 20% e o  $\text{P}_i$  foi quantificado tal como descrito em “Materiais e métodos”. Os valores da inibição por ubaína são expressos em percentagem relativamente ao respectivo controlo (ausência de ubaína e de  $\text{AlCl}_3$ ) e são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 6 determinações independentes.

Na Fig. 15 são apresentados os resultados dos ensaios de actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal realizados na presença simultânea de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  e PST 2238 (0,5 nM – 60  $\mu\text{M}$ ). Na gama de concentrações de PST 2238 de 0,5 nM a 500 nM a actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  manteve-se constante. É de salientar que, apesar de não ter sido observada uma dependência da diminuição da actividade enzimática em função da concentração de PST 2238 nesta gama de concentrações, a actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  registada foi reduzida. Na presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$  a actividade ATPásica sensível a

ubaína 1 mM ((Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase) correspondeu apenas a ~ 25 % da actividade ATPásica total presente na fracção sinaptossomal. Tal como referido anteriormente (pág. 27), nas nossas condições experimentais controlo, isto é, na ausência de AlCl<sub>3</sub> e PST 2238, ~ 40% da actividade ATPásica total ((Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase) é sensível a ubaína 1 mM. Por conseguinte, a não observância da dependência de concentração de PST 2238 até 500 nM da inibição da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase quando AlCl<sub>3</sub> foi adicionado ao meio de reacção poderá ser interpretada como reflectindo a acção inibitória do alumínio na (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. De facto, concentrações de AlCl<sub>3</sub> superiores a 150 µM promovem o seu efeito inibitório máximo (~60 %) enquanto que, na ausência de AlCl<sub>3</sub>, o mesmo grau de redução da actividade enzimática só foi atingido para concentrações de PST 2238 superiores a 25 µM (Fig. 12). A dependência de concentração do efeito inibitório do PST 2238 na (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase foi claramente observada para concentrações do composto superiores a 15 µM mesmo na presença de AlCl<sub>3</sub> 300 µM. O reduzido número de ensaios e condições testadas não permitem esclarecer qual a natureza (sinergismo ou adição) do efeito combinado dos dois inibidores.



**Figura 15 – O  $\text{AlCl}_3$  modifica a dependência de concentração da inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal por PST 2238.**

Os sinaptossomas (0,1 mg de proteína/ml) foram incubados durante 15 minutos à temperatura de 35 °C, num meio contendo  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NaCl}$  128 mM,  $\text{KCl}$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES-Na 10 mM (pH 7,4) e concentrações crescente de PST 2238 ( $5 \times 10^{-10}$  -  $6 \times 10^{-5}$  M). As reacções foram iniciadas pela adição de Mg-ATP (concentração final no meio de reacção igual a 1 mM). A reacção foi finalizada após 5 minutos com a adição de TCA a 20% e o  $\text{P}_i$  foi quantificado tal como descrito em “Materiais e métodos”. Simultaneamente foram também realizados ensaios na ausência de PST 2238 tanto na ausência como na presença de ouabaína 1 mM e de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ . A linha a tracejado representa a percentagem de actividade ATPásica insensível a ouabaína. Os valores da actividade ATPásica são expressos em percentagem relativamente ao respectivo controlo (ausência de ouabaína, de  $\text{AlCl}_3$  e de PST 2238) e são apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão de 4 determinações independentes. A figura 12 (gráfico incluído) é novamente apresentada para facilitar a comparação do efeito do PST 2238 na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  na ausência e na presença de  $\text{AlCl}_3$ .

## IV - Conclusões

Os resultados deste trabalho permitiram retirar as seguintes conclusões relativas ao efeito do PST 2238 na actividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , presente nos terminais nervosos isolados (sinaptossomas) a partir do córtex cerebral do rato.

- O PST 2238 inibe parcialmente a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal sem alterar a actividade enzimática a concentrações milimolares de ubaína.
- Para concentrações superiores a 60  $\mu\text{M}$  foi observado o efeito inibitório máximo, que corresponde a uma redução da actividade enzimática de 70 %.
- O efeito inibitório é dependente de concentração e exhibe um “plateau” intermédio na gama de concentrações de 50 nM a 5  $\mu\text{M}$ .
- A inibição da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal por PST 2238 é alterada por alumínio. A presença de  $\text{AlCl}_3$  300  $\mu\text{M}$ , promove apenas a inibição parcial da actividade enzimática, a dependência de concentração do efeito inibitório do PST 2238 na  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal só foi observada para concentrações do composto superiores a 5  $\mu\text{M}$ .

Os resultados obtidos sugerem que a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sinaptossomal é mais sensível a PST 2238 do que a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  renal, visto que esta actividade enzimática foi significativamente reduzida por PST 2238 50 nM quando avaliada em sinaptossomas, enquanto que uma concentração 100 vezes superior parece ser necessária para provocar a diminuição da actividade de  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  renal (Ferrari *et al*, 1998). Por outro lado, os ensaios preliminares em que o efeito da combinação dos dois inibidores da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (PST 2238 e  $\text{AlCl}_3$ ) foi avaliado, realçaram o potencial do PST 2238 como ferramenta farmacológica no estudo do envolvimento da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  no(s) mecanismo(s) de acção neurotóxica do alumínio.



## V - Bibliografia

Alfrey A. C., Mishell J. M., Bunks J., Contiguglia S. R., Rudolph H., Lewin E., Holmes J. H., 1972. Syndrome of dyspraxia and multifocal seizures associated with chronic hemodialysis. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* 18, 257-61.

Alfrey A.C., LeGendre G. R., Kaehny W. D., 1976. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminium intoxication. *N. Engl. J. Med.* 294,184-8.

Arystarkhova E., Sweadner K. J., 2005. Splice variants of the gamma subunit (FXD2) and their significance in regulation of the Na,K-ATPase in kidney. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 381-386.

Arystarkhova E., Wetzel R., Asinovski N. K. & Sweadner K. J., 1999. The  $\gamma$  subunit modulates Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> affinity of the renal Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 274, 33183-33185.

Bartlett G. R., 1959. Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids. *J. Biol. Chem.* 234, 469-71.

Bauer N., Müller-Ehmsen J., Krämer U., Hambarchian N., Zobel C., Schwinger R. H.G., Neu H., Kirch U., Grünbaum E. G., Schoner W., 2005. Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and Dogs. *Hypertension.* 45,1024-1028.

Béguin P., Wang X., Firsov D., Puoti A., Claeys D., Horisberger J. D. & Geering K., 1997. The  $\gamma$  subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *The EMBO Journal* Vol.16. 14, 4250-4260.

Blanco G., 2005. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin. Nephrol.* 25, 292-303.

Boldyrev A. A., 2001. Na/K-ATPase as an oligomeric ensemble. *Biochemistry* 66, 821-831.

Carvalho C. A. M. & Carvalho A. P., 1979. Effect of temperature and ionophores on permeability of synaptosomes. *J. Neurochem.*33, 309-317.

Caspers M. L., Dow M. J. , Fu M. J., Jacques P. S. & Kwaiser T. M., 1994. Aluminum-induced alterations in [<sup>3</sup>H] ouabain binding and ATP hydrolysis catalysed by the rat brain synaptosomal (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase. *Mol. Chem. Neuropathol.* 22, 43-55.

Caspers M. L., Kwaiser T. M. & Grammas P., 1990. Control of [<sup>3</sup>H] ouabain binding to cerebrovascular (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase by metal ions and proteins. *Biochem. Pharmacol.* 39, 1891-1895.

Caspers M. L., Kwaiser T. M., Dow M. J., Fu M. J. & Grammas P., 1993. Control of the (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase under normal and pathological conditions. *Mol. Chem. Neuropathol.* 19, 65-81.

Chiou S., Vesely D. L., 1995. Dimethyl sulfoxide inhibits renal Na(+)-K(+)-ATPase at a site different from ouabain and atrial peptides. *Life Sci.* 57, 945-955.

- Clausen T., 2003.  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  Pump regulation and skeletal muscle contractility *Physiol. Rev.* 83, 1269–1324, 2003.
- Contreras R. G., Flores-Beni Tez D., Flores-Maldonado C., Larre I., Shoshani L., Cereijido M., 2006.  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase and hormone ouabain: new roles for an old enzyme and an old inhibitor. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 52, 31-40.
- Delprat B., Bibert S., Geering K., 2006. Les protéines FXYD : nouveaux régulateurs de la  $\text{Na}$ , $\text{K}$ -ATPase. *Med. Sci. (Paris)*. 22, 633-638.
- Döllken, A. (1897) Ueber die Wirkung des Aluminium mit besonderer Berücksichtigung der durch das Aluminium verursachten Läsionen im Zentrale-nervensystem. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 40, 98-120.
- Dostanic-Larson I., Lorenz J. N., Van Huysse J. W., Neumann J. C., Moseley A. E., Lingrel J. B., 2006. Physiological role of the  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -isoforms of the  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, 524–528.
- Dvela M., Rosen H., Feldmann T., Nesher M., Lichtstein D., 2007. Diverse biological responses to different cardiotonic steroids. *Pathophysiology*. 14, 159-66.
- Ferrari P., Ferrandi M., Torielli L., Tripodi G., Melloni P., Bianchi G., 1999. PST 2238: A new antihypertensive compound that modulates  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase and antagonizes the pressor effect of OLF. *Cardiovascular Drug Reviews*. 1, 39-57.
- Ferrari P., Ferrandi M., Valentini G., Bianchi G., 2006. Rostafuroxin: an ouabain antagonist that corrects renal and vascular  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase alterations in ouabain and adducin-dependent hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, 529-35.
- Ferrari P., Torielli L., Ferrandi M., Padoani G., Duzzi L., Florio M., Florio M., Conti F., Melloni P., Vesci L., Corsico N. & Bianchi G., 1998. PST2238: A new antihypertensive compound that antagonizes the long-term pressor effect of ouabain. *JPET* 285:83-94.
- Geering K., 2006. FXYD proteins: new regulators of  $\text{Na}$ - $\text{K}$ -ATPase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290, 241-250.
- Gonçalves P., Silva V. S., 2007. Does neurotransmission impairment accompany aluminium neurotoxicity? *Journal of Inorganic Biochemistry*. 101, 1291-1338.
- Goto A., Ishiguro T., Yamada K., Ishii M., Yoshioka M., Eguchi C., Shimura M., Sugimoto T., 1990. Isolation of an urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 1093-1101.



- Gutteridge J. M. C., Quinlan G. J., Clark I. & Halliwell B. 1985. Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochim. Biophys. Acta* 835, 441-447.
- Hajós F., 1975. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.* 93, 485-489.
- Hamlyn J. M., Blaustein M. P., Bova S., DuCharme D. W., Mandel F., Mathews W. R., Ludens J. H., 1991. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 6259-6263.
- Hasler U., Crambert G., Horisberger J. D. & Geering K., 2001. Structural and functional features of the transmembrane domain of the Na,K-ATPase  $\beta$  subunit revealed by tryptophan scanning. *J. Biol. Chem.* Vol. 276. 19, 16356-6364.
- Horisberger J. D., 2004. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology.* 19, 377-387.
- Kanner B. I., Zomot E., 2008. Sodium-coupled neurotransmitter transporters. *Chem Rev.* 108, 1654-1668.
- Kaplan J. H., 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 511-535.
- Kawamura A., Guo J., Itagaki Y., Bell C., Wang Y., Haupt J., Garner T., Magil S., Gallagher R. T., Berova N., Nakanishi K., 1999. On the structure of endogenous ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 6654-6659.
- Kerr D. N. S. & Ward M. K., 1988. In: Metal ions in biological systems. Sigel M. & Sigel A., Marcel Dekker (eds.). New York. 24, pp. 218-251.
- Lal b., Grupa A., Murthy R. C., Ali M. M. & Chandra S. V., 1993. Aluminum ingestion alters behavior and some neurochemical in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 31, 30-35.
- Lamas J. A., 2005. Evolución del concepto de potencial de reposo neuronal. Aspectos básicos y clínicos. *Rev. Neurol.* 41, 538-549.
- Layne E., 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth. Enzymol.* 3, 447-451.
- Liu L., Askari A., 2006. On the importance and mechanism of amplification of digitalis signal through  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* 52, 28-30.
- Martin R. B., 1986. The Chemistry of Aluminum as Related to Biology and Medicine. *Clin. Chem.* 32, 1797-1806.
- Mathews W. R., DuCharme D. W., Hamlyn J. M., Harris D.W., Mandel F., Clark M. A., Ludens J. A., 1991. Mass spectral characterization of an endogenous digitalis like factor from human plasma. *Hypertension.* 17, 930-935.

- Maunsbach A. B., Skriver E. & Hebert H., 1991. Two-dimensional crystals and tree-dimensional structure of Na,K-ATPase analysed by electron microscopy. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 46, 159-172.
- Nicholls D. G., 1989. Release of glutamate, aspartate, and  $\gamma$ -aminobutyric acid from isolated nerves terminals. *J. Neurochem.* 52, 331-341.
- Panchalingam K., Sachedina S., Pettegrew J. W., Glonek T., 1991. Al-ATP as an intracellular carrier of Al(III) ion. *Int. J. Biochem.* 23, 1453-69.
- Pierre S. V., Xie Z., 2006. The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership. *Cell. Biochem. Biophys.* 46, 303-316.
- Quadri L., Bianchi G., Cerri A., Fedrizzi G., Ferrari P., Gobbini M., Melloni P., Sputore S. & Torri M., 1997. 17 $\beta$ -(3-Furyl)-5 $\beta$ -androstane-3 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol (PST 2238). A very potent antihypertensive agent with a novel mechanism of action. *J. Med. Chem.* 40,1561-1564.
- Rensburg S. J. V., Daniels W. M., Potocnik F. C., Zyl J. M. V., Taljaard J. J., Emsley R. A.,1997. A new model for the pathophysiology of Alzheimer's disease. Aluminium toxicity is exacerbated by hydrogen peroxide and attenuated by an amyloid protein fragment and melatonin. *S. Afr. Med. J.* 87, 1111-1115.
- Rutecki P. A., 1992. Neuronal excitability: voltage-dependent currents and synaptic transmission. *J Clin Neurophysiol.* 9, 195-211.
- Sarin S., Gupta V., & Gill K. D., 1997. Alterations in lipid composition and neuronal injury in primates following chronic aluminium exposure. *Biol. Trace Elem. Res.* 59, 133-143.
- Schneider R., Wray V., Nimtz M., Lehmann W. D., Kirch U., Antolovic R., Schoner W., 1998. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J. Biol. Chem.* 273, 784-792.
- Schoner W. & Scheiner-Bobis G., 2007. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 293, 509-536.
- Shamraj O. I. & Lingrel J. B., 1994. A putative fourth Na,K-ATPase alpha subunit gene is expressed in testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 12952-12956
- Shamraj O. I., Melvin D. & Lingrel J. B., 1991. Expression of Na,K-ATPase isoforms in human heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 1434-1440.
- Silva V. S., Duarte A. I., Rego A. C., Oliveira C. R. & Goncalves P. P., 2005. Effect of Chronic Exposure to Aluminium on Isoform Expression and Activity of Rat (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase. *Toxicological Sciences.* 88, 485-494.

- Silva V. S. & Gonçalves P. P., 2003. The inhibitory effect of aluminium on the (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase activity of rat brain cortex synaptosomes. *J. Inorg. Biochem.* 97, 143-50.
- Skou J., 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from the peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 394-401.
- Skou J. C., 1965. Enzymatic basis for active transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45, 596-617.
- Spoofforth, J., 1921. A case of aluminum poisoning. *Lancet* 1, 1301.
- Stengelin M. K. & Hoffman J. F., 1997. Na,K-ATPase subunit isoforms in human reticulocytes: evidence from reverse transcription-PCR for the presence of alpha1, alpha3, beta2, beta3, and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 5943-5948.
- Taniguchi K., Kaya S., Abe K. & Mardh S., 2001. The oligomeric nature of Na/K-transport ATPase. *J. Biochem.* 129, 335-342.
- Tian J., Xie Z. J., 2008. The Na-K-ATPase and calcium-signaling microdomains. *Physiology (Bethesda).* 23, 205-211.
- Vinciguerra M., Mordasini D., Vandewalle A., Feraille E., 2005. Hormonal and nonhormonal mechanisms of regulation of the NA,K-pump in collecting duct principal cells. *Semin. Nephrol.* 25, 312-321.
- Weidemann H., 2005. Na/K-ATPase, endogenous digitalis like compounds and cancer development - a hypothesis. *Front. Biosci.* 10, 2165-2176.
- Xie Z. 2003 Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 986, 497-503.
- Xie Z. & Cai T., 2003. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.* 3, 157-168.
- Yokel R. A., 2000. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology.* 21, 813-828.
- Yokel R. A., Rhineheimer S. S., Sharma P., Elmore D., & McNamara P. J., 2001. Entry, half-life, and desferrioxamine-accelerated clearance of brain aluminum after a single <sup>26</sup>Al exposure. *Toxicol. Sci.* 64, 77-82.